

DNA ポリメラーゼによる *in vivo* での逆転写

逆転写酵素には、RNA を鋳型にした DNA 合成、すなわち逆転写の活性に加えて、DNA を鋳型にした DNA 合成も触媒できるものが知られている。レトロウイルスや LTR レトロトランスポゾンでは、生活環の中で自分の持つ酵素だけで 2 本鎖 DNA を合成しなければならないため、この触媒活性は不可欠である。ならば逆に通常の DNA ポリメラーゼも逆転写を触媒できるのではないだろうか？

実は、いくつかの DNA ポリメラーゼは、*in vitro* では逆転写酵素活性があることが報告されている。DNA ポリメラーゼには系統的に 7 つのグループがある。クラス A、B、C、D、X、Y、そして逆転写酵素 RT である。このうち RT だけが主に RNA を鋳型に用いるタンパク質を含んでいる。*in vitro* で逆転写酵素活性が報告されているのは、原核生物のポリメラーゼ I（クラス A）、真核生物の DNA ポリメラーゼ β （クラス X）、ミトコンドリアで働く γ （クラス A）、 η (eta)、 ι (iota)、 κ (kappa)（いずれもクラス Y）である。様々な系統の DNA ポリメラーゼが RNA を鋳型に DNA 合成をする活性を持っている。しかし、*in vitro* での実験では、短くて配列の単純なポリ A やポリ C などの鋳型を使用していたり、また解析条件が細胞内環境を本当に反映しているのかどうかなどの問題があるため、*in vivo* でこれらの活性が意味を持っているのかどうかについては懐疑的な見方が強かった。

Storici らの論文では、DNA 修復において RNA が鋳型として働いていないかどうか注目している（Storici et al. 2007）。彼女らは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料に、HO エンドヌクレアーゼの発現を誘導することで *LEU2* 遺伝子座での DNA 二重鎖切断を起こし、その DNA 修復に RNA を含むオリゴヌクレオチドが使われるかどうかを調べた。使用したオリゴヌクレオチドは、切断した位置の両側の配列に相補的な DNA または RNA を持ち、その間に数塩基の DNA/RNA を挿入することで修復の際の鋳型として使われているかどうかを確かめられるようにしている。4 塩基の RNA を含むオリゴヌクレオチドを鋳型として使った修復は DNA だけでできているオリゴヌクレオチドを使う場合の 3 分の 1 程度の効率で観察された。そして、RNA の部分の長さが長くなるほど修復効率は低下した。オリゴヌクレオチド全長が RNA の場合の修復の程度は非常に低かったが、それでもオリゴヌクレオチドを入れない場合の数十倍の頻度であった。ちなみにオリゴヌクレオチドを入れた場合の修復では、オリゴヌクレオチドが鋳型として用いられたため対応する配列が挿入されていたが、入れない場合の修復では、非相同末端接合（non-homologous end joining）により、短い配列の挿入や欠失が起っていた。

修復で RNA が鋳型に使われているのでこれはまぎれもなく逆転写反応であるが、出芽酵母の LTR レトロトランスポゾンの Ty1-Ty5 やテロメラーゼが逆転写を触媒している可能性は否定できない。しかし、Ty1 と Ty2 の転写に必要な *SPT3* 遺伝子やテロメラーゼの構成因子の *Est1* 遺伝子を破壊した場合にも修復に影響は見られないため、その可能性は低い。著者らは更に、LTR レトロトランスポゾンが RNA オリゴヌクレオチドを逆転写した cDNA が鋳型として DNA 修復に利用されている可能性を検討している。DNA 二重鎖切断の修復で一本鎖 DNA を鋳型に利用する場合には、DNA の 5' 末端から削られ、反対の鎖の一本鎖が露出する。従って遺伝子上流に二重鎖切断を入れた場合には、遺伝子のコード鎖が削られ、非コード鎖が露出するので、遺伝子のコード鎖と同じ配列のオリゴヌクレオチドを入れる場合の方が非コード鎖よりも効率よく修復される。逆もまた然りである。オリゴヌクレオチドから二本鎖 DNA が合成されている場合にはオリゴヌクレオチドの鎖によらず同じ程度の修復効率になるはずである。簡単に言えば、オリゴヌクレオチドが DNA か RNA かに関わらず鎖による効率の違いが似ていれば、RNA を鋳型にして直接修復が行われているということだし、反対になれば、逆転写によって一本鎖の cDNA が合成され、それが鋳型として利用されているということになる。結果は、DNA と RNA で同じ傾向を示し、上流を切断した場合には、コード鎖を入れた方が修復効率が良く、下流を切断した場合には、非コード鎖を入れた方が修復効率が良い。以上により、cDNA を鋳型にした DNA 修復がほとんど起こっていないことを示された。

DNA 修復における RNA オリゴヌクレオチドの利用は、DNA 二重鎖切断によって 100 倍以上に増える。効率は、Rad51 破壊株でも変化しないし、染色体上の位置の違いも影響しない。鋳型の性質としては、全長が RNA よりも一部でも DNA が含まれていた方が効率よく修復が起こる。その原因が RNA が分解されやすいためかどうかを検討するために、3'-5' exoRNase の遺伝子を破壊したり、RNaseH を破壊したり、3' 側に余分な配列を付加したりなどしたが、明瞭な結論は出ていない。

さて、この RNA を鋳型にした DNA 修復は何が担っているのか？出芽酵母の非必須 DNA ポリメラーゼである *POL4* (クラス X)、*REV1* (クラス Y)、*REV3* (クラス B)、*RAD30* (クラス Y)、*MIPI* (クラス A) の破壊株では効率に変化は見られなかった。そこで彼女らは、必須 DNA ポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ α (クラス B) と δ (クラス B) について *in vitro* での RNA を鋳型とした DNA 合成の効率を調べた (必須遺伝子であるため破壊株を作れない)。4 塩基の RNA を含むオリゴヌクレオチドを鋳型として使った場合には、全長 45 塩基が正常に合成された。RNA の長さを長くすると効率は低下する。効率を計測すると、DNA ポリメラーゼ δ は 4 塩基の RNA を含む場合と DNA だけの場合

とでほとんど変わらない効率で合成していた。一方、DNA ポリメラーゼ α の RNA を含む鋳型の場合の合成効率は、含まない場合の 3 割ほどだった。RNA を含む鋳型の場合は、合成での結合から解離までの所要時間が α は δ の 20 倍となり非常に回転が悪い。従って、DNA ポリメラーゼ δ が DNA 修復での逆転写反応を触媒している可能性が高いと結論づけられている。

しかしながら、DNA ポリメラーゼ δ が触媒できる逆転写は非常に短い配列に限られそうだ。数塩基から数十塩基程度の DNA が RNA に変化するだけでも DNA ポリメラーゼ δ の DNA 合成効率は大幅に低下する。解析で使用された最長の RNA は 80 塩基で、最低 45 塩基から DNA 修復の鋳型に利用できるらしい。結果を見る限り、processed gene の生成など長い RNA の逆転写を必要とする反応に逆転写酵素以外の DNA ポリメラーゼが働いているとは考えにくい。細胞内でこの働きが役に立つとすれば、まずは論文の通り、転写された RNA を鋳型にして、切断された DNA を元通り修復する反応である。そしてもう一つ、進化的に重要な意味を持つかもしれないのは、イントロンの喪失である。スプライシングされた mRNA を鋳型にして修復が行われれば、イントロンが無くなった遺伝子が作られる可能性がある。これまでイントロンの喪失はレトロトランスポゾンが合成した cDNA との組み替えによると考えられて来たが、今後は、RNA を鋳型にした DNA 修復によってイントロンが失われる可能性も考慮すべきだろう。

Storici F, Bebenek K, Kunkel TA, Gordenin DA, Resnick MA.

RNA-templated DNA repair.

Nature. 2007 May 17;447(7142):338-41.

2007/09/11

小島 健司 著

禁 無断複写転載